

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-113396

(43)Date of publication of application : 07.05.1993

(51)Int.Cl.

G01N 15/02  
G01N 15/14

(21)Application number : 03-137552

(71)Applicant : BECTON DICKINSON &amp; CO

(22)Date of filing : 10.06.1991

(72)Inventor : GROSS HANS-JOACHIM  
HOFFMAN ROBERT A

(30)Priority

Priority number : 90 537858

Priority date : 13.06.1990

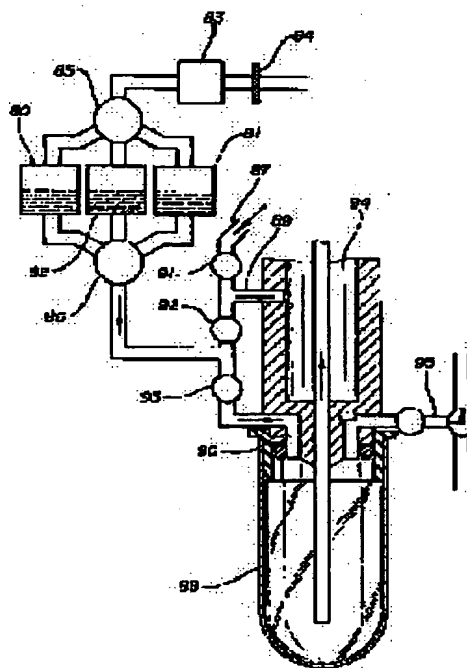
Priority country : US

## (54) WASHING CYCLE FOR FLOW SIGHT METER

## (57)Abstract:

PURPOSE: To provide a washing method for a cell pollution material in a flow sight meter wherein a strong oxidation solution, a non-particle neutral pH fluid and a weak acid are sequentially used.

CONSTITUTION: A reservoir 80 contains a strong oxidation solution, and a reservoir 81 contains a neutral pH fluid, and a reservoir 82 contains a weak acid. The air which pressurizes the reservoir is supplied by a pump 83 in a pipe channel provided with a filter 84. A rotation valve 85 is so provided as to direct an air flow to each reservoir. In addition, with another rotation valve 86, the reservoir is connected to a fluid system.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

21.06.1991

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

2030427

[Date of registration]

19.03.1996

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-113396

(43)公開日 平成5年(1993)5月7日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

G 0 1 N 15/02  
15/14

識別記号

庁内整理番号

A 7005-2 J  
C 7005-2 J

F I

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数10(全 11 頁)

(21)出願番号 特願平3-137552

(22)出願日 平成3年(1991)6月10日

(31)優先権主張番号 5 3 7 8 5 8

(32)優先日 1990年6月13日

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 591007332

ベクトン・ディッキンソン・アンド・カン  
パニー

BECTON-DICKINSON AN  
D COMPANY

アメリカ合衆国ニュージャージー州07417  
-1880, フランクリン・レイクス, ワン・  
ベクトン・ドライブ (番地なし)

(72)発明者 ハンス・ヨーヒム・グロス

ドイツ連邦共和国 フランクフルト/マイ  
ン, シェーネ, アウスジクト 9

(74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外5名)

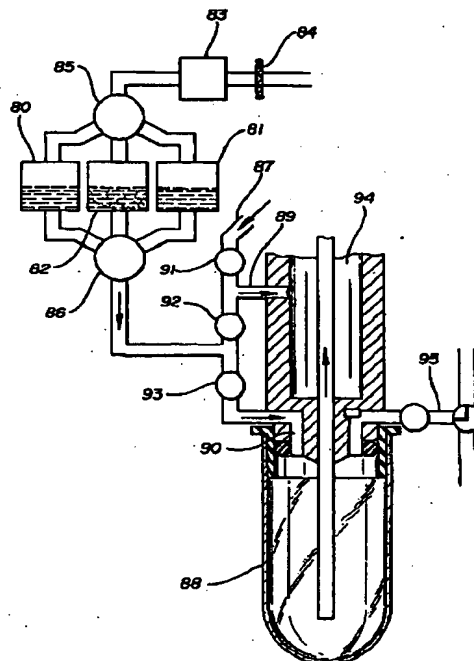
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フローサイトメーターの洗浄サイクル

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 強酸化性溶液、無粒子中性pH流体および弱酸を逐次使用することを含むフローサイトメーター中の細胞汚染物質を洗浄する方法の提供。

【構成】 溜め80は強酸化性溶液を含有し、溜め81は中性pH流体を含有し、溜め82は弱酸を含有する。溜めを加圧する空気は、フィルター84を備えた管路中にあるポンプ83によって供給される。空気の流れをそれぞれの溜めに向けるように、回転弁85が設けられている。さらに別の回転弁86により、溜めは流体系に接続される。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 強酸化性溶液、無粒子中性pH流体および弱酸を逐次流体系に添加することを含むフローサイトメーターを洗浄する方法。

【請求項2】 強酸化性溶液の酸化価が0.7Vよりも大きい請求項1の方法。

【請求項3】 強酸化性溶液がNaOHとNaOClとの混合物およびKOHとKOClとの混合物よりなる群から選ばれる請求項2の方法。

【請求項4】 強酸化性溶液がNaOHとNaOClとの混合物である請求項3の方法。

【請求項5】 弱酸のP<sub>a</sub>値がほぼ3である請求項1の方法。

【請求項6】 弱酸が酢酸およびN-トリクロロ酢酸より成る群から選ばれる請求項5の方法。

【請求項7】 弱酸が酢酸である請求項6の方法。

【請求項8】 フローサイトメーターから細胞汚染物質を除去する方法において、流体系にNaOHとNaOClとの混合物を数分間添加し、空気および被包流体としてのNaOHとNaOClとの混合物で系を洗い流し、アジ化ナトリウムを含む無粒子脱イオン水で系を洗い流し、酢酸で系を洗い流し、さらに被包流体で系を平衡させる逐次工程を含む方法。

【請求項9】 混合物が0.05M NaOHおよび0.07NaOClを含む請求項8の方法。

【請求項10】 自己洗浄能力を有するフローサイトメーターにおいて、強酸化性溶液、無粒子中性pH流体および弱酸を個別的に含む複数の溜めを含み、各溜めは供給管路によって流体系の導入部に接続され、さらに溜めからの流体の流れを個別に制御する弁を各溜めに含むサイトメーター。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】（発明の分野）本発明はフローサイトメーターの洗浄方法に関し、より詳細にはフローサイトメーターおよび関連周辺装置の自動洗浄サイクルに関する。

【0002】（発明の背景）フローサイトメトリーは研究によく受け入れられる手段である。フローサイトメトリーによって使用者は最高毎秒1万個の細胞という割合で数万個の細胞を分析したり選別したりすることができる。この手段の効果は揺がり続け、ごく最近では疾病を評価し、特定する臨床器具としてフローサイトメーターを使用する用途が考えられ、認められるようになった。

【0003】フローサイトメーターの作動方法の完全な説明は多くの参考資料に見出すことができる。HerzenbergらはSci. Amer., 231:108 (1976)において、原型機器の作動および構造を述べている。実質的に、該器は細胞試料を用い、細胞を、1度に実質的に1個ずつ、照射帯域を通過させ、そこで各細胞を光源、典型的にはレーザーのような単一波長の光源によって照射し、各細胞による散乱光を一連の光検出器で集めるように設計されてい

る。実験結果は電算機のようなデータ記憶装置に記憶させて分析する。別の形式では、細胞を、次の実験に用いることができるように、細胞が照射帯域を出るにつれて、光学および他の特性に基づいて分離することができる。フローサイトメーターの2種類の例が米国特許第4,284,412号および同第3,826,364号に示されている。

【0004】細胞を、1度に実質的に1個ずつ照射帯域に流すためには、試料中の細胞を、液体緩衝剤中のノズルアセンブリー（たとえば米国特許第3,826,364号の図1の12参照）を通し、さらに該帯域の無粒子被包流体中に同軸的に供給する。細胞を分離しなければならない場合には、ノズルを特定周波数で振動させて、各滴が単一細胞を含むようにノズル先端に滴を形成させることができる。

【0005】各細胞から集めたデータは2つのタイプに分けられる。すなわち散乱性と免疫蛍光性である。前者の場合には、各細胞は、細胞の大きさおよび粒状によって光源からの光を散乱させる。散乱光は、光源に対して或る角度に置いた光検出器によって集めることができる。他方、免疫蛍光は、蛍光色素に共役している単クローン抗体のような1つ以上の免疫蛍光マーカーによって細胞に標識をつけた関数である。この場合には、蛍光色素が光源によって励起可能であり、重なり合わないピークを有する波長で発光しなければならない。このように、試料中の細胞に1つ以上の免疫蛍光マーカーで標識をつけることによって、散乱および免疫蛍光の両者を特定細胞の同定に用いることができる。米国特許第4,559,307号および同第4,607,007号は試料中の細胞を識別するのに散乱および免疫蛍光を同時に使用することができる方法の2つの例を提示している。

【0006】典型的な実験では、10,000ないし200,000個の細胞が分析される。ほとんどのメーカーは、実験中に、試料緩衝剤を試料ポート中に導入し、ノズル（またはフローセル）を含む系全体を洗浄するために機器中を通すことをすすめている。しかし、この方法を用いると、試料中最高0.1%の細胞が系内に残り、通常の洗浄では洗い落とせないことが判明した。通常、このことは問題となるものではないが、試料中の稀少事象（すなわち、1,000,000分の1の程度で起こる事象）を検索しようとする場合は、先行試料からの0.1%の汚染が真実でない結果をもたらすであろう。

【0007】従って、必要なことは系内の汚染を実質的にゼロに低下させるフローサイトメーターの流体系を洗浄する方法である。

【0008】（発明の要約）本発明は、強酸化性溶液、pH中性液、および弱酸フローサイトメーターの流体系内を逐次通過させるフローサイトメーター洗浄方法より成る。一旦系が洗浄されると、被包流体を用いて、フロ

ーサイトメーターを正常作動状態に戻し、かつ弱酸の少しの残留物をも除去することができる。

【0009】本発明は各流体を逐次試料ポートに導入することによって行うことができる。もしくは、各流体の溜めをフローサイトメーターに組込むことができ、さらに一連の弁の開閉によって、各流体を逐次フローサイトメーター内に導入することができる。

【0010】(発明の詳細な説明)説明上の便宜のため、米国特許第3,826,364号のFig 1に示す流体系をモデル系として示す。この米国特許で示されている流体系(Fig 1)を図5として示す。以後使用する参照番号は図5の番号を指す。本発明の実施が流体系の特定の構成、その個々の成分、流体の流動方向またはフローサイトメーターの使用法に左右されるものではないことは理解されよう。たとえば、試料溜めが無い場合には、試料を使い捨ての試験管に収め、それを試料ポートに取付けて各試料を流した後に除去するFACS-Sea n™フローサイトメーター(Becton Dickinson Immunocytometry Systems)に用いられているような試料ポートがありさえすればよい。試料ポートはさらに試料供給管路に接続する。いずれにしても、系をいかに構成するかは、試料流体に接触する各成分を本発明の方法によって確実に洗浄することほど重要なことではない。

【0011】フローサイトメーターの流体系は試料流体溜め14、試料供給管路18、被包流体溜め16、被包流体管路20、圧力調整器24および26ならびにノズルアセンブリー10より成る。ノズルアセンブリー10は、さらに、流体を供給路18および20からそれぞれ供給する内側および外側に同軸状に設置されたノズル23および30より成る。同軸状の流体のストリーム12は内側細胞含有部分12Aおよび外側無細胞被包流体含有部分12Bより成る。細胞を集める受器は、細胞選別器(すなわち分離器)の場合には、通常68Aないし68Cとして示す通りである。選別を必要としない分析器の場合には、廃棄物排出管路または収集受器(図示せず)があればよい。

【0012】フローサイトメーターを洗浄するには、強酸化性溶液を溜め14および16に入れる。本発明の実施に有用な強酸化性溶液は0.7Vを上回る酸化電位であるべきである。該溶液の例にはNaOHとNaOClとの混合物およびKOHとKOClとの混合物がある。NaOHとNaOClとの混合物が好ましい。調整器24および26によって圧力を加えることなく、該溶液を流体系全体に満たす。10秒ないし10分間系内に該液をとどめるが、30秒が最適である。

【0013】この時間経過後、試料溜め14から系内の該液を抜き取り、試料溜め14を経て空気を導入する。空気を導入しながら、酸化性溶液を加圧して空になるまで被包溜め16から流す。溜めは次に中性pH流体を満たす。この流体は無粒子でなければならない。流体は脱

イオン水であるのが好ましい。アジ化ナトリウムのような防腐剤を添加することができる。防腐剤の目的は微生物の成長を阻止することである。次に中性pH流体を加圧して空になるまで流体系に流す。

【0014】次に、溜め14および16にpH値がほぼ3の弱酸を満たす。本発明の実施に有用な弱酸には0.01M酢酸および0.01M N-トリクロロ酢酸がある。酢酸が好ましい。再び溜めが空になるまで加圧して流体系に流す。

【0015】最後に、被包流体溜め16に被包流体を再充填し、約2分間加圧して流して少しの残留酸をも洗いきる。こうして、流体系には試料を汚染と思われる細胞は実質的になくなっている。

【0016】本系の別の態様では、流体系に3つの溜めを加えることができる。たとえば図4参照。1つの溜め80は強酸化性溶液を含有し、1つの溜め81は中性pH流体を含有し、他の溜め82は弱酸を含有する。溜めを加圧する空気はフィルター84を備えた管路中にあるポンプ83によって供給される。空気の流れをそれぞれの溜めに向けるように回転弁85が設けられている。別の回転弁86によりメーターで計量される共通供給路によって、細胞が系に最初に接触する点(たとえば試料ポート88)において溜めは流体系に接続される。図示態様においては、共通供給路は被包流体流入路87と接続している。この流入路には2個所の入口があり、1つはフローセル89に入る入口で、他は試料ポート88に入る入口である。被包流体の流れはピンチ弁91、92および93によって制御される。試料ポート88からフローセル(図示せず)への試料注入管をおおまかに94で示す。試料ポートを加圧する別の計量空気供給源をおおまかに95で示す。

【0017】別の態様では、試料のプログラム可能な染色に続いて試料をフローサイトメーターに導入させるFACS Prepr™(BDIS)のような試料調製部を本発明によって洗浄するように修正することもできる。この態様では、上記溜めシステムを単独または系と組合せてフローサイトメーターに組込むことができる。

【0018】本方法の有効性を示すために、種々の細胞試料を流すのに使用したFACS can™フローサイトメーターをメーカーの指示に従って(たとえば、流体系を家庭用漂白剤溶液を流し、次いで被包流体で洗い流すことによって)洗浄した。次に「サンプル(sample)」としてリン酸塩緩衝食塩水(無粒子)をフローサイトメーターの中に流した。散乱の2つの測定値を記録し、蛍光の3つの測定結果を記録した(ゲートで制御せず)。試験結果を図1に示す。見てわかるように、通常の洗浄法を用いると散乱および蛍光に著しいバックグラウンドレベルが検知された。

【0019】本発明により、0.05M NaOHと0.07M NaOClとの混合物より成る強酸化性溶

液、無粒子脱イオン水、および0.01M酢酸を逐次フローサイトメーター中に流した。次に「サンプル」としてフローサイトメーターの中にPBSを流した。再び、散乱の2つの測定結果および蛍光の3つの測定結果を記録した。図2および3からわかるように、9時間のPBS「サンプル」後に、ゲート内では散乱によって僅か6つの事象のみ記録され、蛍光では全く記録されなかった。このように、フローサイトメーターの流体系の汚染は実質的にゼロに減少した。

【0020】本明細書に挙げた出版物および特許出願はすべて本発明が関係する当業者の水準を示すものである。すべての出版物および特許出願は、具体的かつ個別に個々の出版物または特許出願を参考資料として収録すると示した場合には、その範囲で参考資料として本明細書に収録する。

【0021】添付クレームの精神または範囲から逸脱せずに本発明に多々の変更および修正をなし得ることは当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

\*

\*【図1】製造業者の指示に従って通常のように維持され、洗浄されたフローサイトメーターについて、無粒子リン酸塩緩衝食塩水をフローサイトメーターに流した場合の(A)前方光散乱(FSC)対側方光散乱(SSC)、(B)蛍光1(FL1)対蛍光3(FL3)、(C)蛍光2(FL2)対蛍光1(FL1)、および(D)蛍光2(FL2)対蛍光3(FL3)の4つのドット・プロット・パターンである。

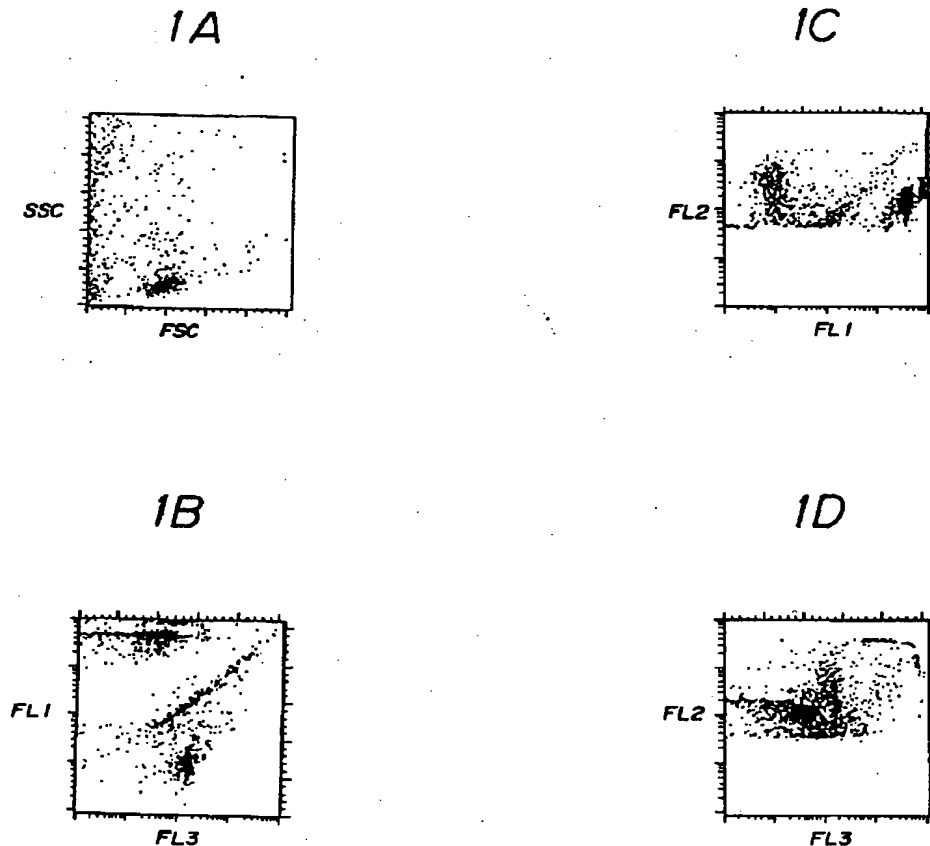
【図2】ゲートで無制御の事象について、本発明の方法を用いてフローサイトメーターを洗浄した後の図1と同じドット・プロット・パターンである。

【図3】ゲートで制御した事象について本発明の方法を用いてフローサイトメーターを洗浄した後の図2と同じドット・プロット・パターンである。

【図4】本発明によって系を洗浄するように設備されたフローサイトメーター流体系の1つの態様の略図である。

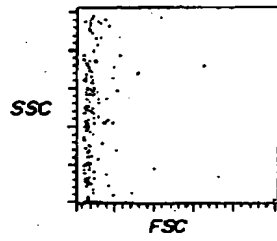
【図5】米国特許第3,826,364号で示されている流体系を示す概略図である。

【図1】

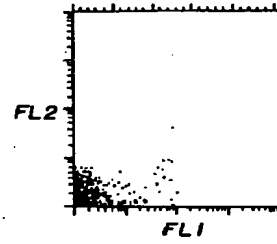


【図2】

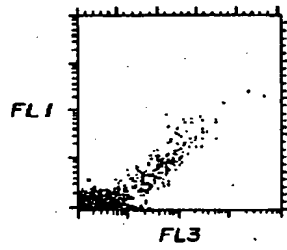
2A



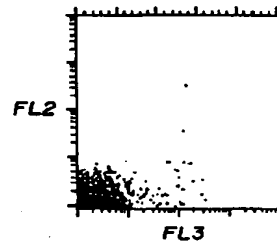
2C



2B

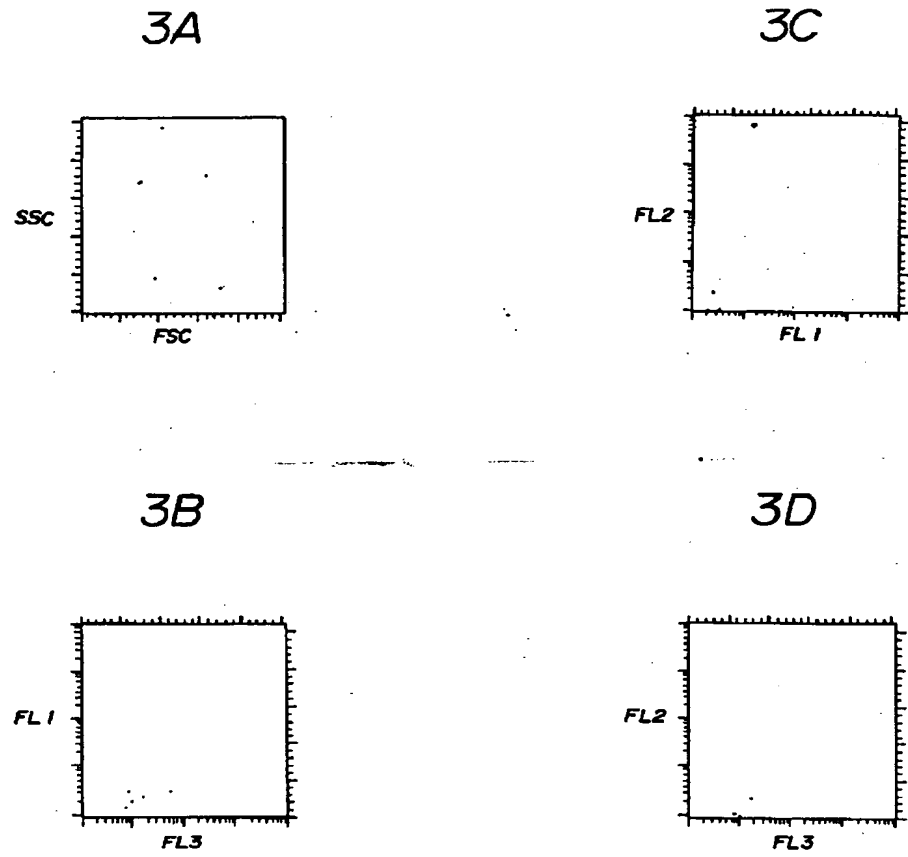


2D

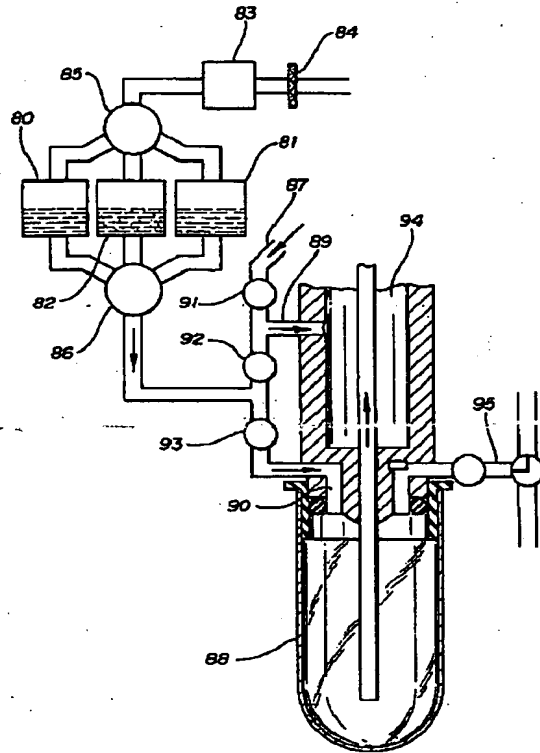




【図3】



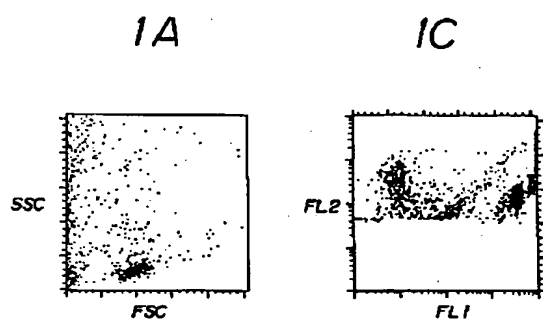
【図4】



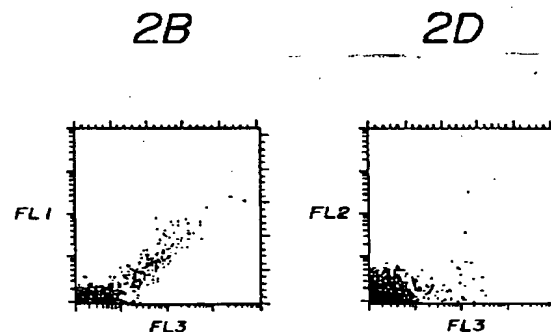
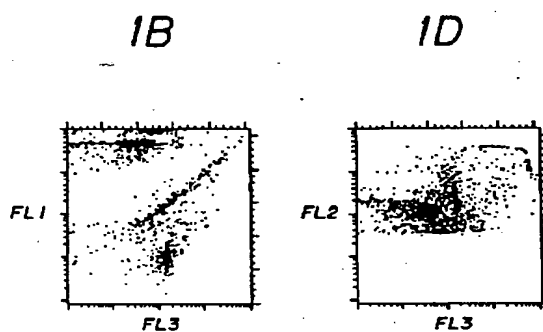
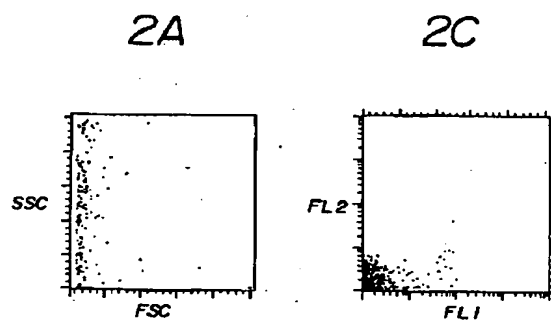
[illegible]

【補正内容】

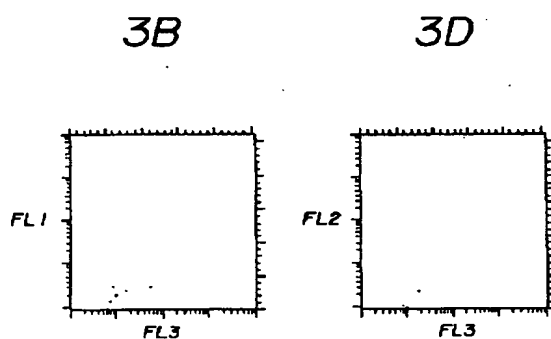
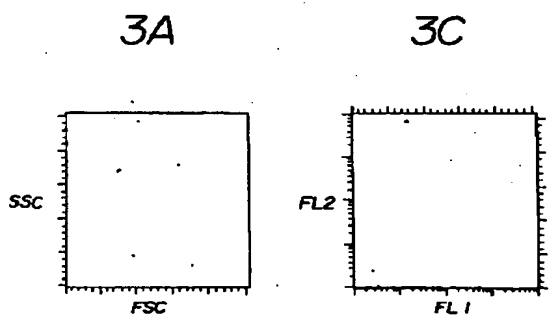
【図1】



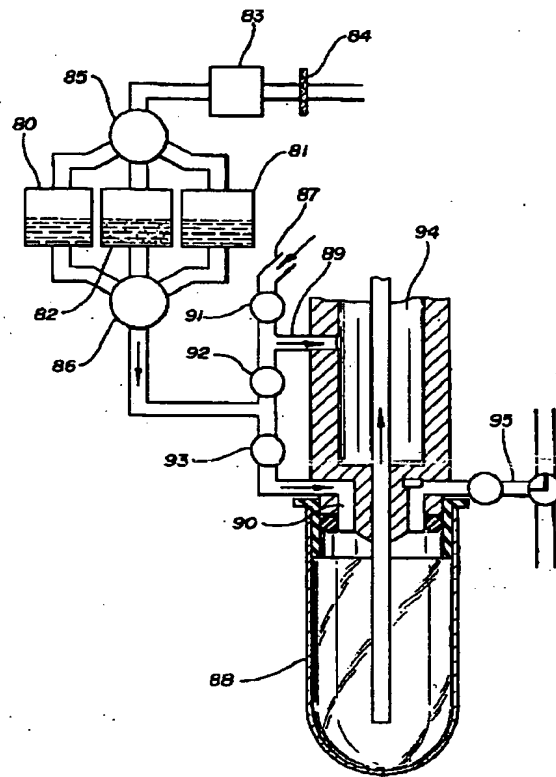
【図2】



【図3】



【図4】



(72)発明者 ロバート・エー・ホフマン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州94550,  
リバーモア, マーズ・ロード 2129